

B.S.K.B.  
Rijiro WATANABE et al.

4-29-99

90-4559

3084

JCS25 U.S. PAT. & TM. OFF. 09/30/1766

04/29/99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 4月30日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第120551号

出 願 人

Applicant(s):

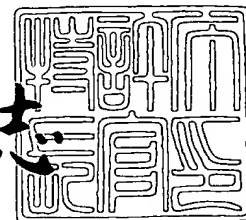
住友化学工業株式会社

1999年 3月19日

特 許 庁 長 官

Commissioner,  
Patent Office

伴 佐 山 建 志



出証番号 出証特平11-3015387

【書類名】 特許願

【整理番号】 P149180

【提出日】 平成10年 4月30日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/52

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子

【請求項の数】 17

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
社内

    【氏名】 渡辺 英二郎

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
社内

    【氏名】 大江田 憲治

【特許出願人】

    【識別番号】 000002093

    【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

    【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

    【識別番号】 100093285

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 久保山 隆

    【電話番号】 06-220-3404

【選任した代理人】

    【識別番号】 100094477

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 神野 直美

    【電話番号】 06-220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する蛋白質をコードするアブラナ科植物由来のラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 2】

アブラナ科植物がカラシナである請求項1記載のラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 3】

配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 4】

配列番号2に示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 5】

アブラナ科植物がナタネである請求項1記載のラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 6】

配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 7】

配列番号4に示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 8】

請求項1～7記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片。

【請求項 9】

ハイブリダイゼーション法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を検出する方法において、請求項8記載のDNA断片をプローブに用いるラフ

イノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片の検出方法。

【請求項 10】

PCR(Polymerase Chain Reaction)法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を増幅する方法において、請求項1～7記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いるラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片の増幅方法。

【請求項 11】

請求項9記載の検出方法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を検出し該DNA断片を単離する工程を含むラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法。

【請求項 12】

請求項10記載の増幅方法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を増幅し該DNA断片を単離する工程を含むラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法。

【請求項 13】

請求項1～7記載のラフィノース合成酵素遺伝子がプロモーターと連結されてなるDNA断片。

【請求項 14】

請求項1～7記載のラフィノース合成酵素遺伝子または請求項8もしくは13記載のDNA断片を含有するベクター。

【請求項 15】

請求項13記載のDNA断片または請求項14記載のベクターが宿主の細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項 16】

宿主が微生物である請求項15記載の形質転換体。

【請求項 17】

宿主が植物である請求項15記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、ラフィノース合成酵素遺伝子等に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

ラフィノース類オリゴ糖は、一般式として $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)  
 $n$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-フルクトフラノシドで示されるショ糖  
の誘導体であり、 $n=1$ の場合にはラフィノース、 $n=2$ の場合にはスタキオース、 $n=$   
3の場合にはベルバコース、 $n=4$ の場合にはアジュコースと呼ばれる。

ラフィノース類オリゴ糖は、ショ糖を除けば、植物で最も含量の多いオリゴ糖  
であり、例えば、トウヒ等のマツ科の裸子植物、および、ダイズ、インゲンマメ  
等のマメ科、ナタネ等のアブラナ科、甜菜等のアカザ科、ワタ等のアオイ科、ポ  
プラ等のヤナギ科等の被子植物などの高等植物のみならず、クロレラにも含まれ  
る。該オリゴ糖は、多くの植物において、貯蔵器官や種子における貯蔵糖として  
の役割を果たし、また、ある種の植物においては、組織間を糖が移動する現象に  
おける転流糖としての役割を果たしている。

このようなラフィノース類オリゴ糖は、食品中に適量存在すると腸内細菌フロ  
ーラの状態を健全にする効果を示すことが知られている。このため、ラフィノー  
ス類オリゴ糖は機能性食品素材として一部の食品に添加され、特定保健用食品分  
野において利用され始めている。

ラフィノース類オリゴ糖は、多くの植物においてショ糖を初発とするラフィノ  
ース類オリゴ糖生合成系により生成される。この生合成系は、通常、ショ糖分子  
中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基に、ガラクトチノ  
ール由来のガラクトシル基が $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合によって順次付加される反応により構  
成されている。該生合成系の最初の段階において、ショ糖分子中のD-グルコース  
残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基に、ガラクトチノール由来のD-ガラ  
クトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる反応に関  
与する酵素がラフィノース合成酵素である。該酵素は前記生合成系における律速  
段階となっていることが示唆されており、該酵素がラフィノース類オリゴ糖の生  
合成の制御に重要である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、植物のラフィノース類オリゴ糖の含量を制御するために上記のようなラフィノース合成酵素の植物における発現量や活性を変化させる技術に利用可能なラフィノース合成酵素遺伝子が切望されている。

【0004】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、カラシナおよびナタネ由来のラフィノース合成酵素遺伝子を見出し、本発明に至った。

すなわち、本発明は、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する蛋白質をコードするアブラナ科植物由来のラフィノース合成酵素遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）、該遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片、該DNA断片を利用するラフィノース合成酵素遺伝子の検出方法、本発明遺伝子の部分塩基配列を利用するラフィノース合成酵素遺伝子の増幅方法、該検出方法もしくは該増幅方法を利用するラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法、本発明遺伝子がプロモーターと連結されてなるDNA断片、本発明遺伝子もしくは上記DNA断片を含有するベクターおよび該ベクターが宿主の細胞に導入されてなる形質転換体を提供するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。なお、以下に記述された遺伝子工学的方法は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X、Current Protocols In Protein Science (1995), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-11184-8等の記載に準じて実施可能である。

【0006】

本発明遺伝子はカラシナ、ナタネ等のアブラナ科植物由来のラフィノース合成

酵素をコードする遺伝子であり、具体的には例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号2に示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号4に示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子等をあげることができる。

【0007】

本発明遺伝子は、例えば、配列番号2で示される塩基配列もしくはその一部を有するDNA断片または配列番号4で示される塩基配列もしくはその一部を有するDNA断片（以下、本DNA断片と記す。）をプローブとするハイブリダイゼーション法により、該プローブとハイブリダイズするDNA断片をアブラナ科植物由来のDNAから検出し、該DNA断片を単離することにより得ることができる。

まず、本DNA断片を調製する。該DNA断片としては、例えば、配列番号2または配列番号4で示される塩基配列に基づいて通常の方法で化学合成されたオリゴヌクレオチドからなるDNA断片があげられる。

また、本DNA断片は、配列番号2または配列番号4で示される塩基配列に基づいて通常の方法で化学合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCR法により調製してもよい。例えば、カラシナ(*Brassica juncea*)、ナタネ(*Brassica napus*)等のアブラナ科植物の組織を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢などを用いて物理的に磨砕することにより細かい粉末状の組織片とし、該組織片から通常の方法によりRNAを抽出する。該抽出操作には、市販のRNA抽出キットを利用することができる。得られたRNA抽出液からエタノール沈澱によりRNAを回収し、このRNAから通常の方法によりポリA鎖を有するRNAを分画する。該分画操作には、市販のOligo dTカラムを利用することができる。このようにして得られたポリA鎖を有するRNAから通常の方法によりcDNAを合成する。該合成操作には、市販のcDNA合成キットを利用することができる。、前記cDNAを鋳型として、配列番号2または配列番号4で示される塩基配列を基にして設計・合成されたプライマーを用いてPCRを行なうことにより、本DNA断片を増幅する。ここでプライマーとし



ては、例えば、下記リスト 1 に示されるプライマー 1 と 2 をあげることができ、該プライマーを用いてカラシナ由来の cDNA を鋳型として PCR を行うことにより、配列番号 2 の塩基番号 1~467 に示される塩基配列を有する DNA 断片を増幅することができ、該プライマーを用いてナタネ由来の cDNA を鋳型として PCR を行うことにより、配列番号 4 の塩基番号 1~467 に示される塩基配列を有する DNA 断片を増幅することができる。増幅された DNA 断片は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」 (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X 等に記載される通常の方法に準じてクローニングすることができる。TA クローニングキット (Invitrogen 社) 等の市販のクローニングキットや、pBluescript II (Stratagene 社の) 等の市販のプラスミドベクターなどを用いてクローニングしてもよい。クローニングされた DNA 断片の塩基配列の確認は、F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson 著、Proceedings of National Academy of Science U.S.A. (1977), 74, 5463 頁-5467 頁等に記載されるダイデオキシターミネーティング法により行なうことができる。例えば、市販のパーキンエルマー社の ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit などを利用すると良い。

【0008】

(リスト 1)

プライマー 1 TTGGAAGAGA AGACGCCGCC GGAATCGTC 30mer

プライマー 2 TTAAGCCCCG GCGAGAGCTC TGGCCGGACA 30mer

【0009】

次いで、本 DNA 断片を標識しこれをハイブリダイゼーション法におけるプローブとしてアブラナ科植物由来の DNA にハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合する DNA 断片を検出することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含む DNA 断片を検出する。

アブラナ科植物由来の DNA としては、例えば、カラシナ、ナタネ等のアブラナ科植物の cDNA ライブラリーや genomic DNA ライブラリー等を使用することができる。このような遺伝子ライブラリーには、市販の遺伝子ライブラリーをそのまま

用いることもできるし、また「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーを用いることもできる。

ハイブリダイゼーション法としては、ブランクハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションをあげることができ、ライブラリーの作製に用いられたベクターの種類に応じて選択する。具体的には、使用されるライブラリーがファージベクターを用いて構築された場合には、まずライブラリーのファージを適当な宿主微生物と感染可能な条件下で混合して形質転換体を得た後、該形質転換体を軟寒天培地と混合し、寒天培地上にまく。その後適当な大きさのブランクが現れるまで37℃で培養を行う。また、使用されるライブラリーがプラスミドベクターで構築された場合には、まずライブラリーのプラスミドを適当な宿主微生物に導入し、形質転換体を得る。得られた形質転換体を適当に希釈して寒天培地にまき、適当な大きさのコロニーが現れるまで37℃で培養を行う。いずれのライブラリーの場合も上記の培養後、寒天培地の表面にメンブレンフィルターをのせ、ファージまたは形質転換体をメンブレンに転写する。このメンブレンをアルカリによる変性処理後、中和処理し、例えばナイロンメンブレンの場合には該メンブレンに紫外線を照射することにより、ファージまたは形質転換体のDNAをメンブレン上に固定する。次にこのメンブレンについて、通常の方法により標識された本DNA断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーション法を行う。この方法については、例えば、D M Glover編「DNA cloning, a practical approach.」 IRL PRESS (1985) ISBN 0-947946-18-7を参考にとよい。ハイブリダイゼーションを行う際の試薬及び温度条件は多種存在するが、一般的には例えば、プレハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーション溶液 [6×SSC (0.9M NaCl, 0.09M クエン酸)、0.1~1 (w/v) % SDS、100 μg/ml 変性サケ精巢DNA] にメンブレンを浸して65℃で1時間インキュベートする。次に、ここへ標識された本DNA断片を加えて混合し、42~68℃で4~16時間保温することによりハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーション終了後メンブレンを取り出し、これ

を0.1~1(w/v)%SDSを含む2×SSCで洗浄し、さらに0.1~1(w/v)%SDSを含む0.2×SSCですすいだ後乾かす。このメンブレンを、例えば、オートラジオグラフィーなどにより解析してメンブレン上のプローブの位置を検出することにより、用いたプローブと相同性のある塩基配列を有するDNAのメンブレン上の位置を検出することができる。このようにして検出されたDNAのメンブレン上の位置に相当するクローンをもとの寒天培地上で特定しこれを釣菌することにより、当該DNAを有するクローンを単離することができ、さらに、同様の検出操作を繰り返すことで当該DNAを有するクローンを純化することができる。

また、市販のGibcoBRL社のGENE TRAPPER cDNA Positive Selection Systemキットの様な検出の方法を用いることもできる。この方法では、まず一本鎖化したDNAライブラリーとビオチン化した本DNA断片（プローブ）とをハイブリダイズさせた後、これにストレプトアビジン結合マグネットビーズを加えて混合し、この混合物からストレプトアビジン結合マグネットビーズを磁石で回収することで、本DNA断片、ビオチンおよびストレプトアビジンを介して該ビーズに結合した1本鎖DNA断片、すなわち、用いたプローブと相同性のある塩基配列を有する1本鎖DNA断片を回収する。尚、回収された1本鎖DNA断片は適当なオリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼを反応させることにより2本鎖化することができる。

#### 【0010】

上記のように本DNA断片とハイブリダイズするDNAをアブラナ科植物由来の遺伝子ライブラリーのDNAから検出し、当該DNAを保有するクローンを純化して該クローンからファージまたはプラスミドDNAを単離することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を取得することができる。このようにして得られたDNA断片について通常の方法により制限酵素地図を作成するかまたは塩基配列を決定することにより、本発明遺伝子を含むDNA断片を確認することができる。さらに、このようにして得られる本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片をプローブとして上記と同様に所望の生物由来のDNAにハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するDNA断片を検出することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を検出する（以下、本発

明検出方法と記す。) ことができる。

【0011】

本発明遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いるPCR法により、所望の生物由来のDNAからラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を増幅する(以下、本発明増幅方法と記す。) ことが可能である。

具体的には、例えば、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを設計し、通常の合成方法によりこれを化学合成する。オリゴヌクレオチドの長さとしては、一般的に、アニーリングの特異性が確保される点からは塩基数が多い方がよく、プライマー自身が高次構造を取り易くアニーリング効率が悪くなる恐れがある点や合成後の精製時に煩雑な操作が必要となる点からは塩基数が多すぎない方がよく、通常、塩基数が15以上50以下が好ましい。コドン表(図1)に基づき、1つのアミノ酸をコードしうるコドンのバリエーションに応じてプライマーの特定の位置の残基を数種類の塩基の混合物とするミックスプライマーを合成することもできる。また、例えば、複数種の塩基と対合できるイノシンなどの塩基を数種類の塩基の混合物の代わりに用いることもできる。尚、ここで、2本鎖DNAからなる本発明遺伝子のコーディング鎖と同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをセンスプライマー、該コーディング鎖の塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマーと呼ぶ。

本発明遺伝子のコーディング鎖の5'上流側の塩基配列を有するセンスプライマーと、3'下流側の塩基配列と相補的な塩基配列を有するアンチセンスプライマーを組み合わせて用いて、例えば、遺伝子ライブラリー、ゲノムDNAまたはcDNAを鋳型としてPCR反応を行いDNA断片を増幅する。ここで用いられる遺伝子ライブラリーとしては、例えば、カラシナ、ナタネなどのアブラナ科植物等のcDNAライブラリーやgenomicDNAライブラリー等をあげることができる。該遺伝子ライブラリーとしては、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーを用いることもできるし、また市販の遺伝子ライブラリーをそのまま用いることもでき

る。ゲノムDNAまたはcDNAとしては、例えば、目的のアブラナ科植物等から調製されたgenomicDNAやcDNAをあげることができる。このようにして増幅されたDNA断片は通常の電気泳動法により確認することができ、該DNA断片は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてクローニングすることができる。該DNA断片について通常の方法により制限酵素地図を作成するかまたは塩基配列を決定することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子またはその一部を含むDNA断片を確認することができる。該DNA断片がラフィノース合成酵素遺伝子の一部を含む場合は、その塩基配列に基づき、該塩基配列の5'末端より上流の塩基配列を含むDNA断片または該塩基配列の3'末端より下流の塩基配列を含むDNA断片の増幅をPCR法で行うことができる。すなわち、上記のようにして得られたDNA断片の塩基配列に基づいて、5'末端側上流部分の増幅にはアンチセンスプライマーを、3'末端側下流部分の増幅にはセンスプライマーをそれぞれ設計し合成する。これらのプライマーを用いて、例えば、Clontech社のMarathon Kit等の市販のキットを用いてRACE法を行うことにより、ラフィノース合成酵素遺伝子の既得部分の5'末端より上流または3'末端より下流の塩基配列を明らかにすることができる。このようにして明らかにされた塩基配列に基づいて新たにプライマーを合成し、再度PCRを行うことにより完全長のラフィノース合成酵素遺伝子を取得することができる。

#### 【0012】

上述の本発明検出方法を植物の解析に利用してもよい。具体的には、植物ゲノムDNAを、例えば、渡辺格監修、杉浦昌弘編集：「クローニングとシークエンス(植物バイオテクノロジー実験マニュアル)」、農村文化社、東京(1989)などに記載された通常の方法に従って調製し、適当な少なくとも数種類の制限酵素で切断し、電気泳動した後、泳動されたDNAを通常の方法に従ってフィルターにブロットニングする。このフィルターに本DNA断片から通常の方法で調製されたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行ない、プローブがハイブリダイズするDNA断片を検出する。検出されたDNA断片の長さを特定植物種の異なる品種につ

いて比較し、その長さの違いから、品種間のラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質の差を解析することができる。また、上記の方法により検出されたDNA断片の長さを遺伝子組換え植物と同種の非遺伝子組換え植物とで比較したときに、遺伝子組換え植物において非遺伝子組換え植物よりもハイブリダイズするバンドが数多くまたは濃く検出された場合、該植物が遺伝子組換え植物であると判別することができる。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコール」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、90-94頁に記載されるRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法に準じて行なうことができる。

## 【0013】

また、本発明増幅方法をアブラナ科植物等の遺伝子の解析に利用してもよい。具体的には、例えば、アブラナ科植物等から調製した植物ゲノムDNAを鋳型として、本発明増幅方法を行ない、DNA断片を増幅させる。増幅されたDNA断片をホルムアルデヒド溶液と混合し、85℃で5分間加熱変性処理を行った後、氷上で急冷する。このサンプルをグリセロールを0(v/v)%または10(v/v)%含む、例えば6(w/v)%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動に供する。この電気泳動には市販のSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)用の電気泳動装置を用いることができ、例えば5℃、25℃、37℃等にゲルの温度を一定に保って電気泳動を行なう。電気泳動したゲルから、例えば、市販の試薬による銀染色法等の方法によりDNA断片を検出する。検出されたDNA断片の電気泳動における挙動の品種間の差からラフィノース合成酵素遺伝子内の変異を検出し、該変異に基づいて生じる、ラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質における品種間の差を解析する。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコール」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、141-146頁に記載されるSSCP法に準じて行うことができる。

## 【0014】

本発明遺伝子を宿主の細胞で発現させるには、本発明遺伝子がプロモーターと連結されてなるDNA断片（以下、本発明発現DNA断片と記す。）を利用するとよい。該DNA断片においてプロモーターは、該DNA断片が導入され形質転

換される宿主の細胞内で機能可能なものであれば特に制限はない。例えば、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーター、tacプロモーター等の大腸菌内で機能可能な合成プロモーター、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(ADH)プロモーター、アデノウイルス・メジャーレート(Ad.ML)プロモーター、SV40の初期プロモーター、バキュロウイルスプロモーターなどがあげられる。また、宿主が植物である場合には、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子(OCS)プロモーターなどのT-DNA由来の構成型プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の19S及び35Sプロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ(CHS)遺伝子のプロモーター、Pathogenesis-related protein(PR)遺伝子のプロモーターなどの誘導プロモーターなどをあげることができる。また、特定の植物組織で特異的に発現するようなプロモーター、例えば、ダイズ由来種子貯蔵蛋白質グリシニン遺伝子のプロモーターを持つベクターpSUM-GY1(特開平06-189777)などを使用することもできる。

さらに、本発明発現DNA断片にターミネーターを連結させてもよい。この場合、発現させようとするラフィノース合成酵素遺伝子の下流にターミネーターを有するように連結すると一般的によい。用いられるターミネーターは、形質転換される宿主の細胞内で機能可能なものであれば特に制限はないが、例えば宿主が植物の場合には、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)ターミネーターなどのT-DNA由来の構成型ターミネーター、ニンニクウイルスGV1、GV2のターミネーターなどの植物由来のターミネーターなどをあげることができる。

#### 【0015】

かかる本発明発現DNA断片を通常の遺伝子工学的方法に準じて宿主の細胞に導入することにより形質転換体を得られる。尚、宿主の細胞に導入するための形質転換方法に応じて、必要であれば、本発明発現DNA断片を適当な選抜マーカー遺伝子を有するベクターに挿入して使用するとよい。

本発明発現DNA断片が挿入されたベクターは、例えば、宿主が微生物の場合には、「Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold

Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の手段により微生物に導入することができ、該ベクターにより形質転換された微生物は抗生物質耐性や栄養要求性等の選抜マーカーにより選抜される。又、例えば、宿主が植物の場合には、本発明発現DNA断片が挿入されたベクターは、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917および特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887および特開平5-68575)、またはパーティクルガン方法(特開平5-508316および特開昭63-258525)などの通常の手段により植物細胞に導入することができ、該ベクターの導入により形質転換された植物細胞はカナマイシンまたはハイグロマイシン等の抗生物質耐性などの選抜マーカーにより選抜される。このようにして形質転換された植物細胞から、例えば内宮著、「植物遺伝子操作マニュアル(トランスジェニック植物の作り方)」1990年、講談社サイエンティフィック(ISBN4-06-153513-7)、27-55頁に記載される通常の植物細胞培養方法により形質転換植物を再生することにより形質転換体植物が得られる。さらに、得られた形質転換体植物から種子を得ることにより該形質転換体植物の増殖を行うこともできる。また、得られた形質転換体植物と非形質転換体植物とを交雑することで形質転換体の形質をもつ子孫植物を作成することもできる。

【0016】

本発明遺伝子を上記のように植物に導入し発現させることにより、植物におけるラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させることができ、植物のラフィノース類オリゴ糖含量が制御され得る。本発明遺伝子はとりわけ、遺伝子の相同性に基づいてアブラナ科植物のラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させる、例えば相同組換えやコサプレッション等の技術において有用である。

【0017】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例にのみ限定されるものではない。

【0018】



## 実施例1 (cDNAの作成)

カラシナ (*Brassica juncea*) の葉約2gを液体窒素で凍結し、乳鉢で粉碎した。Isogen(ニッポンジーン社)を20ml加え、さらに良くすりつぶした。該破碎物を遠心管に移し、4mlのクロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌した後、これを4℃で6, 500 × g、10分間遠心分離し、水層を回収した。回収された水層に10mlのイソプロパノールを加えて攪拌した後、4℃にて6, 500 × g 10分間遠心分離した。得られた沈殿を10mlの70%エタノールで洗浄した後、これを180  $\mu$  lのDEPC-処理済み滅菌水で溶解した。該溶解物を55℃で5分間おいた後、該溶解物に10  $\mu$  lの5M NaClを加えた。得られた溶液はBIOMAG mRNA PURIFICATION KIT(PerSeptive Biosystems社:Catalog No. 8-MB4003K)を用いて精製した。

得られたmRNA溶液に3M酢酸ナトリウムとエタノールを加え、RNAをエタノール沈澱し、これを回収した。回収されたRNAを70%エタノールで2回洗浄し、これを20  $\mu$  lの滅菌水に溶解し、cDNA合成に用いた。得られたRNAは260nmの吸光度を測定し、定量した。

cDNA合成には、Clontech社のSMART PCR cDNA Synthesis Kitを用い、すべての操作はキットに添付のプロトコールに従った。

ナタネWestar (*Brassica napus*) の未熟種子からも上記と同様にしてmRNAを精製し、cDNA合成を行った。

【0019】

## 実施例2 (ラフィノース合成酵素遺伝子の塩基配列の解析)

下記リスト2で示される塩基配列の合成DNAプライマーを合成した。PCRは、Clontech社のAdvantage KlenTaq cDNA Kitを用いてパーキンエルマー社のGene Amp PCR Systems 2400とDNA Thermal Cycler Model 480で行なった。上記プライマーを用い、実施例1により得られたカラシナのcDNAを用いてPCR反応を行った。反応は94℃1分間、次いで50℃3分間、72℃3分間の保温を1サイクルとして、この反応を40サイクル行った。その結果、約1.2kbのバンドの増幅が見られた。増幅されたDNA断片をTAクローニングキット(Invitrogen社)でクローニングし、パーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitを用いてシーケンス反応を行ない、ABI社373S DNA シーケンサーで塩基配

列の解析を行った。その結果得られた塩基配列をもとにリスト3で示される塩基配列の合成DNAプライマーを作成し、実施例1で得られたカラシナ(*Brassica juncea*)とナタネWestar(*Brassica napus*)のcDNAを用いて上記と同様のPCRを行った。その結果、最終的にカラシナ(*Brassica juncea*)のcDNAから配列番号2で示される塩基配列が、ナタネWestar(*Brassica napus*)のcDNAから配列番号4に示される塩基配列が明らかになった。

【0020】

(リスト2)

#1 35mer

CGATTIAAIG TITGGTGGAC IACICAITGG GTIGG

#10RV 38mer

CAITGIACCA TITGICAICC ITGIA(AG)CCAI TAIGTICC

【0021】

(リスト3)

primer-1 30mer

GTTAGGGTTC ATATGAACAC CTTCAAGCTC

primer-2RV 26mer

CAACGGCGAG ATCTTGCATC GTCAAC

【0022】

(配列の簡単な説明)

1. 配列番号1:

配列番号1に示される配列は、カラシナより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子にコードされるラフィノース合成酵素蛋白質のアミノ酸配列を示す。

2. 配列番号2:

配列番号2に示される配列は、カラシナより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子のcDNA塩基配列を示す。

3. 配列番号3:

配列番号3に示される配列は、ナタネより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子にコードされるラフィノース合成酵素蛋白質のアミノ酸配列を示す。

4. 配列番号4:

配列番号4に示される配列は、ナタネより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子のcDNA塩基配列を示す。

5. リスト1:

リスト1に示される配列は、ラフィノース合成酵素遺伝子のcDNA断片の増幅に用いられるプライマーの塩基配列の一例を示す。プライマー1はカラシナ及びナタネ由来ラフィノース合成酵素のcDNA断片の5'-末端に相当するセンスプライマー、プライマー2は3'-末端側に相当しアンチセンスプライマーである。目的に応じて適当にこれらの塩基配列の5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を加えることができる。

6. リスト2:

リスト2に示される配列は、カラシナ由来ラフィノース合成酵素遺伝子断片のcDNA塩基配列の解析の際に用いたプライマーの塩基配列を示す。Iで示した塩基はイノシンを合成に用いたことを示す。また、括弧で括られた塩基はこれらの混合物をDNA合成の際に用いたことを示す。なお、プライマー番号の後に記載の「RV」はこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

7. リスト3:

リスト3に示される配列は、カラシナ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列に基づいて合成されたプライマーである。プライマー番号の後に記載の「RV」はこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

【0023】

【発明の効果】

本発明により、ラフィノース合成酵素の植物における発現量や活性を変化させる技術に利用可能なアブラナ科植物由来ラフィノース合成酵素遺伝子を提供することが可能となった。

【0024】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:154

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴

起源

生物名: カラシナ (*Brassica juncea*)

品種名: カラシナ

組織の種類: 葉

配列

Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Pro	Pro	Gly	Ile	Val	Asp	Lys	Phe	Gly	Trp	Cys				
																5	10	15	
Thr	Trp	Asp	Ala	Phe	Tyr	Leu	Thr	Val	Asn	Pro	Asp	Gly	Val	His	Lys				
																20	25	30	
Gly	Val	Lys	Cys	Leu	Val	Asp	Gly	Gly	Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Val	Leu				
																35	40	45	
Ile	Asp	Asp	Gly	Trp	Gln	Ser	Ile	Gly	His	Asp	Ser	Asp	Gly	Ile	Asp				
																50	55	60	
Val	Glu	Gly	Met	Ser	Cys	Thr	Val	Ala	Gly	Glu	Gln	Met	Pro	Cys	Arg				
																65	70	75	80
Leu	Leu	Lys	Phe	Gln	Glu	Asn	Phe	Lys	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Pro				
																85	90	95	
Lys	Asp	Lys	Asn	Glu	Val	Gly	Met	Lys	Ala	Phe	Val	Arg	Asp	Leu	Lys				
																100	105	110	
Glu	Glu	Phe	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Val	Trp	His	Ala	Leu	Cys				
																115	120	125	
Gly	Tyr	Trp	Gly	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser				
																130	135	140	
Thr	Ile	Val	Arg	Pro	Glu	Leu	Ser	Pro	Gly	Leu									
																145	150	154	

【0025】

配列番号：2

配列の長さ：467

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1..465

特徴を決定した方法：E

配列

TTG GAA GAG AAG ACG CCG CCG GGA ATC GTC GAT AAG TTC GGG TGG TGC	48
Leu Glu Glu Lys Thr Pro Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys	
5 10 15	
ACG TGG GAT GCG TTT TAT TTG ACG GTG AAC CCT GAC GGA GTT CAT AAG	96
Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Thr Val Asn Pro Asp Gly Val His Lys	
20 25 30	
GGT GTT AAG TGT CTC GTC GAC GGT GGT TGT CCG CCG GGA TTG GTC CTA	144
Gly Val Lys Cys Leu Val Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu	
35 40 45	
ATC GAC GAC GGT TGG CAA TCG ATT GGA CAT GAC TCC GAT GGT ATC GAT	192
Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Gly His Asp Ser Asp Gly Ile Asp	
50 55 60	
GTT GAA GGG ATG AGT TGT ACC GTC GCC GGG GAG CAA ATG CCT TGC AGG	240
Val Glu Gly Met Ser Cys Thr Val Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg	
65 70 75 80	
CTT CTG AAA TTT CAA GAG AAC TTC AAG TTC AGA GAC TAC GTC TCT CCG	288
Leu Leu Lys Phe Gln Glu Asn Phe Lys Phe Arg Asp Tyr Val Ser Pro	

85	90	95	
AAA GAC AAA AAC GAA GTC GGG ATG AAA GCT TTC GTC AGA GAT CTG AAA			336
Lys Asp Lys Asn Glu Val Gly Met Lys Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys			
100	105	110	
GAA GAA TTC TCC ACC GTT GAT TAC ATC TAC GTC TGG CAC GCG CTT TGC			384
Glu Glu Phe Ser Thr Val Asp Tyr Ile Tyr Val Trp His Ala Leu Cys			
115	120	125	
GGC TAC TGG GGT GGT CTT CGT CCC GGA GCT CCT ACT CTT CCG CCC TCA			432
Gly Tyr Trp Gly Gly Leu Arg Pro Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ser			
130	135	140	
ACT ATT GTC CGG CCA GAG CTC TCG CCG GGG CTT AA			467
Thr Ile Val Arg Pro Glu Leu Ser Pro Gly Leu			
145	150	154	

【0026】

配列番号: 3

配列の長さ: 154

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴

起源

生物名: ナタネ (Brassica napus)

品種名: Westar

組織の種類: 種子

配列

Leu Glu Glu Lys Thr Pro Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys		
5	10	15
Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Thr Val Asn Pro Asp Gly Val His Lys		
20	25	30

Gly Val Lys Cys Leu Val Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu  
 35 40 45  
 Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Gly His Asp Ser Asp Gly Ile Asp  
 50 55 60  
 Val Glu Gly Met Ser Cys Thr Val Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg  
 65 70 75 80  
 Leu Pro Lys Phe Gln Glu Asn Phe Lys Phe Arg Asp Tyr Val Ser Pro  
 85 90 95  
 Lys Asp Lys Asn Glu Val Gly Met Lys Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys  
 100 105 110  
 Glu Glu Phe Ser Thr Val Asp Tyr Ile Tyr Val Trp His Ala Leu Cys  
 115 120 125  
 Gly Tyr Trp Gly Gly Leu Arg Pro Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ser  
 130 135 140  
 Thr Ile Val Arg Pro Glu Leu Ser Pro Gly Leu  
 145 150 154

【0027】

配列番号：4

配列の長さ：467

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1..465

特徴を決定した方法：E

配列

TTG GAA GAG AAG ACG CCG CCG GGA ATC GTC GAT AAG TTC GGG TGG TGC 48

Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Pro	Pro	Gly	Ile	Val	Asp	Lys	Phe	Gly	Trp	Cys	
				5					10					15		
ACG	TGG	GAT	GCG	TTT	TAT	TTG	ACG	GTG	AAC	CCT	GAC	GGA	GTT	CAT	AAG	96
Thr	Trp	Asp	Ala	Phe	Tyr	Leu	Thr	Val	Asn	Pro	Asp	Gly	Val	His	Lys	
			20					25					30			
GGT	GTT	AAG	TGT	CTC	GTC	GAC	GGT	GGT	TGT	CCG	CCG	GGA	TTG	GTC	CTA	144
Gly	Val	Lys	Cys	Leu	Val	Asp	Gly	Gly	Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Val	Leu	
			35				40					45				
ATC	GAC	GAC	GGT	TGG	CAA	TCG	ATT	GGA	CAT	GAC	TCC	GAT	GGT	ATC	GAT	192
Ile	Asp	Asp	Gly	Trp	Gln	Ser	Ile	Gly	His	Asp	Ser	Asp	Gly	Ile	Asp	
			50			55				60						
GTT	GAA	GGG	ATG	AGT	TGT	ACC	GTC	GCC	GGG	GAG	CAA	ATG	CCT	TGC	AGG	240
Val	Glu	Gly	Met	Ser	Cys	Thr	Val	Ala	Gly	Glu	Gln	Met	Pro	Cys	Arg	
			65			70				75			80			
CTT	CCG	AAA	TTT	CAA	GAG	AAC	TTC	AAG	TTC	AGA	GAC	TAC	GTC	TCT	CCG	288
Leu	Pro	Lys	Phe	Gln	Glu	Asn	Phe	Lys	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Pro	
			85						90				95			
AAA	GAC	AAA	AAC	GAA	GTC	GGG	ATG	AAA	GCT	TTC	GTC	AGA	GAT	CTG	AAA	336
Lys	Asp	Lys	Asn	Glu	Val	Gly	Met	Lys	Ala	Phe	Val	Arg	Asp	Leu	Lys	
			100					105				110				
GAA	GAA	TTC	TCC	ACC	GTT	GAT	TAC	ATC	TAC	GTC	TGG	CAC	GCG	CTT	TGC	384
Glu	Glu	Phe	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Val	Trp	His	Ala	Leu	Cys	
			115					120				125				
GGC	TAC	TGG	GGT	GGT	CTT	CGT	CCC	GGA	GCT	CCT	ACT	CTT	CCG	CCC	TCA	432
Gly	Tyr	Trp	Gly	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
			130			135				140						
ACT	ATT	GTC	CGG	CCA	GAG	CTC	TCG	CCG	GGG	CTT	AA					467
Thr	Ile	Val	Arg	Pro	Glu	Leu	Ser	Pro	Gly	Leu						
			145			150				154						



【図面の簡単な説明】

【図 1】

図1は、塩基配列にコードされるアミノ酸の対応を示すコドン表である。コドンは、'5-末端が左側にくるように示し、mRNAにおける塩基配列を示している。UはRNAにおけるウラシル塩基を示しており、DNAにおいてはチミン塩基に相当する。

【書類名】

図面

【図 1】

Phe	UUU UUC	UCU UCC UCA UCG	Tyr UAU UAC	Cys UGU UGC
Leu	UUA UUG	UAA UAG	Stop	Stop UGA
	CUU CUC	CCU CCC	His CAU CAC	CGU CGC
	CUA CUG	CCA CCG	Gln CAA CAG	Arg CGA CGG
Ile	AUU AUC AUA	ACU ACC ACA ACG	Asn AAU AAC	Ser AGU AGC
Met	AUG		Lys AAA AAG	Arg AGA AGG
Val	GUU GUC GUA GUG	GCU GCC GCA GCG	Asp GAU GAC	Gly GGU GGC GGA GGG
			Glu GAA GAG	

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

ラフィノース合成酵素の植物における発現量や活性を変化させる技術に利用可能なラフィノース合成酵素遺伝子を提供すること。

【解決手段】

ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する蛋白質をコードするアブラナ科植物由来のラフィノース合成酵素遺伝子等。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100093285

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内

【氏名又は名称】 久保山 隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内

【氏名又は名称】 神野 直美

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社